

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

特許第3300493号

(P3300493)

(45) 発行日 平成14年 7 月 8 日 (2002. 7. 8)

(24) 登録日 平成14年 4 月 19 日 (2002. 4. 19)

(51) Int.Cl.⁷

G 0 1 N 33/543

識別記号

5 8 1

F I

G 0 1 N 33/543

5 8 1 B

請求項の数 7 (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平5-227097

(22) 出願日 平成 5 年 9 月 13 日 (1993. 9. 13)

(65) 公開番号 特開平7-83928

(43) 公開日 平成 7 年 3 月 31 日 (1995. 3. 31)

審査請求日 平成12年 1 月 11 日 (2000. 1. 11)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 899000024

株式会社 先端科学技術インキュベシ
ョンセンター

東京都千代田区丸の内一丁目 5 番 1 号
新丸の内ビルディング 6 階

(72) 発明者 岩田 恵助

埼玉県久喜市青毛1192-2

(72) 発明者 民谷 栄一

石川県能美郡辰口町大口ノ 1-1 職員
宿舍 A 棟 1 階 15 号室

(72) 発明者 輕部 征夫

神奈川県川崎市宮前区東有馬 1 丁目 3 番
地 16

(74) 代理人 100106002

弁理士 正林 真之 (外 1 名)

審査官 竹中 靖典

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生物学的特異的反応性物質の存在を検出又は測定する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 担体粒子上での生物学的特異的凝集反応により生物学的特異的反応性物質の存在の検出または測定する方法であって、

担体粒子がパールチェーン化をするように、交流電圧を該反応系に印加することを特徴とする前記方法。

【請求項 2】 交流が 10 kHz 乃至 10 MHz の周波数であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 10 mM 以上の塩の共存下、10 乃至 50 V/mm の臨界強度になるように、交流電圧を該反応系に印加することを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】 担体粒子上での生物学的特異的凝集反応により生物学的特異的反応性物質の存在の検出または測定する方法であって、

10 mM 以上の塩の共存下、10 kHz 乃至 10 MHz の周波数の交流電圧を該反応系に印加することを特徴とする前記方法。

【請求項 5】 10 乃至 300 mM の塩の共存下であることを特徴とする請求項 1 乃至 4 の何れかに記載の方法。

【請求項 6】 担体粒子の平均粒径が 0.5 乃至 10 μ m であることを特徴とする請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】 反応系中の担体粒子の濃度が、0.01 乃至 1 重量%であることを特徴とする請求項 1 乃至 6 のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は担体粒子上での生物学的

B4

特異的凝集反応により、生物学的特異的反応性物質の存在を検出又は測定する方法に関する。更に詳しくは、塩の共存下に交流電圧を該反応系に印加することにより、従来よりも迅速且つ簡便に、しかも高感度で生物学的特異的反応性物質の存在を検出又は測定する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】生物学的特異的反応性物質の存在を検出又は測定する方法としては、例えば、酵素免疫測定法、放射線免疫測定法が従来より用いられている。これらの方法は高感度であり精度も高い。しかし酵素、放射線を使用するため試薬が不安定であることや保管・保存上の規制があることから、測定において細かい配慮や技術を要求されるので、より簡便な方法が求められていた。またこれらの方法は測定に比較的長時間を要するため、緊急検査においては対処が困難とされ、高感度且つ迅速な方法がさかんに研究されるようになった。

【0003】1970年以降、ラテックス、血球等の担体上での特異的凝集反応を測定する各種の光学的分析方法が開発されている。これらの分析システムにおける反応温度は、一般的には37～45℃の範囲で行われ、攪拌翼などによって攪拌することにより特異的凝集反応が進行する。このとき測定（反応）に要する時間は、およそ10～20分であり、酵素免疫測定法、放射線免疫測定法に比べ迅速であるが、測定感度、測定範囲が前記測定法に比べ劣るといわれている。

【0004】免疫学的凝集反応を促進し、また形成する凝集塊を検出しやすくするために、反応系に直流パルス電圧を印加することが知られている。例えば、特開昭59-173761（鈴木ら）及び松岡らによるAnal. Chem., 57巻, 1998～2002頁（1985）には、カンディダ・アルビカンスの蒸留水懸濁液と抗体の蒸留水溶液を、電極を備えたキューベットの注入混合後、パルス高さ100V（電界強度100V/mm）の直流パルス電圧を印加して凝集反応を促進することにより約5分の反応時間で凝集率が約50%になると記載されている。

【0005】また民谷らによるBiosensors, 3(3), 139～146頁（1988）には、ラテックス粒子に結合したヒト免疫グロブリンGに対する抗体の蒸留水中懸濁液とヒト免疫グロブリンGの蒸留水溶液を電極を備えたキューベットの混合後、パルス高さ200V（電界強度200V/mm）の直流パルス電圧を印加して、10分後に50%の凝集度が得られたと記載されている。

【0006】

【解決すべき課題】しかしながら、前記の直流パルス電圧を印加する方法ではまだ凝集反応の促進が不充分なため、測定時間、測定感度、測定精度に関して十分に満足のいくものとはなっていない。また、前記の直流パルス

を印加する方法では反応液の電気分解が起こりやすいという欠点があり、電気分解を起こさないようにするため、反応液の塩濃度を極力低くする必要があった。したがって、測定試料、特に生体試料においては反応系中の塩濃度を調製するための前処理が必要となるなど簡便な方法とはいえなかった。

【0007】したがって本発明の目的は、上記したような問題点を改善し従来の測定方法よりも更に簡便且つ迅速で、しかも高感度で生物学的特異的反応性物質の存在を検出又は測定することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、担体粒子上での生物学的特異的凝集反応により生物学的特異的反応性物質の存在を検出又は測定する際に、該反応系に交流電圧を印加することにより、直流パルス電圧を印加した場合よりも、反応液の電気分解を著しく抑制でき、そのため該反応系に生物学的特異的凝集反応を促進する作用のある塩を存在させることができることを見出した。本発明はかかる知見に基づき達成されたものである。

【0009】すなわち、本発明は、担体粒子上での生物学的特異的凝集反応により生物学的特異的反応性物質の存在を検出又は測定する方法であって、10mM以上の塩の共存下に5～50V/mmの電界強度になるように交流電圧を該反応系に印加することの特徴とするものである。

【0010】担体粒子は、電場をかけると直線的に並ぶこと（この現象をパールチェーン化と呼ぶ）、その後電場を停止すると直線的に並んでいた担体粒子は再分散することが知られている。パールチェーン化の際に生物学的特異的反応性物質が存在すると、電場を停止後も担体の再分散が起こらず、パールチェーン化した担体の存在がなお認められる。したがって、電場を停止後も再分散しない、すなわち生物学的特異的凝集反応に関与している凝集粒子を測定することにより生物学的特異的反応性物質の存在を検出又は測定できるのである。

【0011】本発明の目的を達成するには、（1）電場をかけたときの担体のパールチェーン化の促進、（2）電場を停止後、生物学的特異的凝集反応に関与していない担体の再分散の促進、（3）電場を停止後、生物学的特異的凝集反応に関与しパールチェーン化している担体の再分散の防止・抑制、（4）電場をかけたとき塩が存在している反応液の電気分解の抑制、が重要となる。本発明は上記（1）～（4）の条件をすべて満たすことにより従来の測定方法よりも簡便且つ迅速に、しかも高感度で生物学的特異的反応性物質の存在を検出又は測定することができるのである。

【0012】本発明において「生物学的特異的凝集反応」なる用語は、ある物質が特定の物質又はごく少数の特定の物質群とのみ反応し、担体粒子上で凝集するよう

な反応を示すものとし、幅広い反応を含み得る。例えば、抗原またはハプテンと抗体との反応（免疫反応）、相補的な核酸間のハイブリダイゼーション、レクチンとそのレセプターとの反応などを挙げることができる。

【0013】本発明における「生物学的特異的反応性物質」は、上記の生物学的特異的凝集反応をし、ラテックス、血球等を担体として使用する凝集法で測定され得る物質から選択できる。例えば、AFP、CEA、CA19-9、hCG、フェリチン等の腫瘍マーカー、プロテインC、プロテインS、AT III、FDP、D-ダイマー等の凝固線溶系マーカー、CRP、ASO、HBs抗原、HBs抗体等の感染症マーカー、TSH、プロラクチン、インシュリン等のホルモン、IgG、IgE、IgA、C3、C4等の免疫グロブリン及び補体成分、ミオグロビン、ミオシン等の組織成分、DNA等の核酸が挙げられる。

【0014】本発明において印加する電圧は、交流電圧であることが必須である。交流電圧とすることにより、直流パルス電圧の場合よりも反応液の電気分解が起こりにくく、したがって反応液中に塩の存在を許容できるとなる。後述するように、塩が存在することにより生物学的特異的凝集反応は促進される。また塩の存在が許容されるため、生体試料等を前処理することなく測定できる。

【0015】本発明において、交流電圧は波高値の電圧を示すものとする。

【0016】本発明の交流電圧の波形は連続波、パルス波のいずれであっても良く、また任意の形状とし得るが、好ましくは方形波、矩形波、正弦波、三角波等である。最も好ましくは方形波である。

【0017】本発明の交流電圧は電界強度が5～50V/mmとなるように印加することが必須である。電界強度が5V/mmよりも小さいと担体のパールチェイン化が起こりにくく、したがって凝集反応の促進が不十分となる。電界強度が50V/mmより大きいと反応液の電気分解が起こりやすく、凝集反応の測定が困難となる。交流電圧は、より好ましくは10～30V/mm、最も好ましくは10～20V/mmの電界強度が得られるように印加する。

【0018】本発明の交流の周波数は、検討した範囲内では生物学的特異的凝集反応の速度に大きく影響しないが、好ましくは10KHz～10MHzの周波数、より好ましくは50KHz～1MHzの周波数である。

【0019】本発明の担体粒子としては、ラテックス粒子、ベントナイト、カオリン、金コロイド、赤血球細胞、ゼラチン、リボソーム等が挙げられる。ラテックス粒子としては、凝集反応において一般に用いられているものが使用できる。ポリスチレン系ラテックス、ポリビニルトルエン系ラテックス、ポリメタクリレート系ラテックスなどであり、官能基モノマー（-COOH、-O

H、-NH₂、-SO₃等）が共重合して導入されたタイプのものでもよい。好ましい担体はラテックス粒子である。

【0020】反応系中の担体粒子の濃度が高いほどパールチェインが形成されやすいので凝集反応が促進される。また、担体粒子の濃度が高いほど生物学的特異的反応性物質が存在しない場合に再分散したときの担体粒子の凝集度が大きくなる傾向がある。反応系中の担体粒子の濃度は、例えばラテックス粒子の場合、好ましくは0.01～1重量%、より好ましくは0.025～0.5重量%、最も好ましくは0.05～0.1重量%である。

【0021】担体粒子の平均粒径は、例えばラテックス粒子の場合、0.5～10μmが好ましい。平均粒径が0.5μm以下又は10μm以上であるとパールチェインが形成されにくく好ましくない。担体粒子の平均粒径は、例えばラテックス粒子の場合、さらに好ましくは1～5μm、最も好ましくは2～3μmである。

【0022】本発明では、塩が反応系中に10mM以上の比較的高い濃度で存在することが必須である。10mM以下の塩濃度では生物学的特異的凝集反応の促進が十分でなく、また本発明の目的を達成できない。塩が反応系中に600mM以上の濃度で存在すると反応液の電気分解が起こり易くなるので好ましくない。より好ましい塩の濃度は10～300mM、最も好ましい塩の濃度は25～150mMである。生体試料等が本発明でいう塩を含有している場合には、反応系での塩濃度が上記の範囲に入るように試薬の調製を行なう。

【0023】直流パルスを用いる場合では約6mMの塩濃度の反応液でも電気分解が起こるため、塩の存在下では生物学的特異的凝集反応の測定は困難である。

【0024】本発明における塩は生物学的特異的凝集反応を促進するものの中から選択され得る。例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硝酸ナトリウム、硝酸カリウム、塩化アンモニウムが挙げられるがこれに限定されるものではない。好ましい塩は例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化アンモニウム等であり、モル電気伝導度が10mM、25℃の水溶液において100cm²/(Ω・mol)以上の値を示す塩である。

【0025】本発明の好ましい態様としては、生物学的特異的反応性物質が抗原及び/又は抗体である該方法が挙げられる。抗原/抗体としては、前記のものが挙げられ、好ましくはミオグロビン/抗ミオグロビン抗体、ヒトAFP/ヒトAFP抗体等が挙げられる。

【0026】更なる本発明の好ましい態様として、担体粒子が抗体を感作させたラテックス粒子であり、生物学的特異的反応性物質が抗原である該方法が挙げられる。ラテックス粒子への抗体の感作は、例えば、従来周知の方法でラテックス粒子に抗体を吸着又は結合させることにより実施することができる。抗原及び抗体としては、

前記した組み合わせのものが例示できる。

【0027】

【実施例】以下、実施例及び比較例をもって本発明を詳細に説明するが、これらは本発明を限定するものではない。

【0028】実施例1 印加時間と再分散時間

(1) 抗ミオグロビン抗体感作ラテックス試薬の調製
0.375mgの抗ミオグロビン抗体 (Organon Teknika N. V. 製) を8mlのグリシン緩衝液 (0.1Mグリシン、50mM塩化ナトリウム、0.05%アジ化ナトリウム含有、以下GBSと略す) に溶解し、2.16 μ mの蛍光標識ラテックス (ポリサイエンス社、固形分2.5%懸濁液) 2mlを加え室温で2時間攪拌した後、感作したラテックスを遠心分離して上清を除去した。沈殿を0.2%牛血清アルブミンのグリシン緩衝液溶液 (0.2%BSA-GBS) 25mlに懸濁させ、抗ミオグロビン抗体感作ラテックス試薬を調製した。

【0029】(2) 測定装置

図1の装置を使用し生物学的特異的凝集反応を測定した。スライドガラス1、2にはさまれた電極3、4 (電極の厚さ: 0.02mm、電極間の距離: 0.5mm) に交流電源供給装置により交流電圧を印加する。蛍光顕微鏡7、CCDカメラ8、画像処理ボード9、パーソナルコンピュータ10より成る画像処理装置により、担体の凝集状態を測定する。

【0030】(3) 測定方法

0.5%牛血清アルブミンのグリシン緩衝液溶液 (0.5%BSA-GBS) を用いて、標準ミオグロビンを希釈して、濃度0及び100ng/mlの検体を調製した。これらの検体10 μ l、前述した抗ミオグロビン抗体感作ラテックス試薬10 μ lをスライドガラス上で混合させ、前述した装置を用いて、周波数100KHzの交流電圧 (方形波) を20V/mmの電界強度で1分間印加しパールチェーンを形成させた。反応系におけるラテックス粒子の濃度は0.1重量%であった。この1分間の印加後、直ちに電源を切り1~2分間放置することにより生物学的特異的凝集反応に関与していないラテックス粒子を再分散させた後、画像処理装置を用いて、ラ

テックス粒子の凝集度 (AR) を、以下の式により求めた。そして、5画面の平均をとって凝集度とし、反応性を測定した。

$$\text{【0031】 } AR = (2 \text{ 個以上に凝集した粒子数}) / (\text{総粒子数}) \times 100 \quad (\%)$$

(4) 結果

図2に凝集度の経時的な変化を示した。ミオグロビン濃度が100ng/mlの検体は、交流電圧を1分間印加することにより約90%の凝集度 (AR) を示し、電源を切って1~2分間再分散させても凝集度は約80%でほぼ一定であった。一方、ミオグロビン濃度が0ng/mlの検体は、交流電圧を1分間印加することにより約90%の凝集度 (AR) を示したが、電源を切って1~2分間再分散させることにより凝集度は約20%となった。このことは、1分間の交流電圧の印加で担体は十分に凝集し、また印加後直ちに電源を切り1~2分間放置することにより、生物学的特異的凝集反応に関与していないラテックス粒子はほぼ完全に再分散するが、生物学的特異的凝集反応に関与しているラテックス粒子はほとんど再分散しないことを示している。

【0032】実施例2 印加電圧の影響

(1) 抗ミオグロビン抗体感作ラテックス試薬の調製
実施例1と同様にして抗ミオグロビン抗体感作ラテックス試薬を調製した。

【0033】(2) 測定装置

図1の装置を使用し生物学的特異的凝集反応を測定した。

【0034】(3) 測定方法

100KHzの交流電圧 (方形波) を表1に示した電界強度になるように1分間印加しパールチェーンを形成させた。この1分間の印加後、直ちに電源を切り1分間放置することにより実施例1と同様にしてラテックス粒子の凝集度 (AR) を測定した。

【0035】(4) 結果

表1の結果から、電界強度としては5~50V/mm、より好ましくは10~30V/mm、最も好ましくは10~20V/mmであることが分かる。

【0036】

【表1】

| 交流電界強度 (100KHz) | 凝集度 AR (%) | |
|--------------------|-----------------------|-------------|
| | ミオグロビン濃度 | |
| | 0 μ g | 100 μ g |
| 5V/mm | 12.6 | 24.8 |
| 10V/mm | 16.0 | 62.4 |
| 20V/mm | 20.8 | 80.8 |
| 30V/mm | 34.6 | 84.8 |
| 70V/mm | (反応溶液が電気分解されたため測定できず) | |

【0037】なお、直流パルス (周波数8KHz、パルス幅20 μ sec、電界強度20V/mm) を印加した

場合、直ちに反応液が電気分解を起こし凝集度は測定不能であった。

【0038】実施例3 交流周波数の影響

周波数10KHz～10MHzの交流電圧（方形波）を電界強度が20V/mmとなるように印加し、実施例2と同様にして凝集度を測定した。表2に示した結果から、交流周波数は10KHz～10MHzの間では生物学的特異的凝集反応に大きな影響を与えないことが分かる。

【0039】

【表2】

| 交流周波数 (方形波) | 凝集度 AR (%) | |
|----------------|------------|-------------|
| | ミオグロビン濃度 | |
| | 0 μ g | 100 μ g |
| 10KHz | 33.7 | 74.4 |
| 100KHz | 20.6 | 80.8 |
| 1MHz | 24.9 | 76.2 |
| 10MHz | 30.0 | 70.7 |

【0040】実施例4 ラテックス粒子の濃度の影響

ラテックス粒子の濃度が反応系に対して0.025～0.5重量%になるように抗ミオグロビン抗体感作ラテックス試薬を実施例1と同様にして調製した。交流電圧（周波数100KHz、電界強度20V/mm、方形波）を印加して、凝集度を実施例2と同様にして測定した。表3に結果を示す。

【0041】

【表3】

| ラテックス 濃度 (重量%) | 凝集度 AR (%) | |
|----------------------|------------|-------------|
| | ミオグロビン濃度 | |
| | 0 μ g | 100 μ g |
| 0.025 | 9.8 | 45.0 |
| 0.050 | 15.9 | 64.0 |
| 0.075 | 18.3 | 77.6 |
| 0.100 | 20.8 | 80.8 |
| 0.500 | 40.0 | 80.0 |

【0042】実施例5 ラテックス粒子の粒径の影響

下記の表4に記載した平均粒径のラテックス粒子を用い、ラテックス粒子の濃度が反応系に対して表4に記載の濃度になるように抗ミオグロビン抗体感作ラテックス試薬を実施例1と同様にして調製した。交流電圧（周波数100KHz、電界強度20V/mm、方形波）を印加して、ラテックス粒子のパールチェーンを実施例1と同様にして形成させ、パールチェーンの形成の有無を観察した。表4に示した結果から、ラテックス粒子の平均粒径は0.5～10 μ m、好ましくは1～5 μ m、より好ましくは2～3 μ mであることが分かる。正弦波、三角波の交流電圧（周波数100KHz、電界強度20V/mm）においても同様な結果が得られた。

【0043】

【表4】

| ラテックス粒子の平均粒径 | ラテックス濃度 | 電界の印加時間 | パールチェーンの形成 |
|--------------|---------|---------|------------------------|
| 1.0 μ m | 1% | 5秒以内 | 5～15個のパールチェーンを形成 |
| 5 μ m | 1% | 5秒以内 | 10～40個の巨大なパールチェーンを形成 |
| 3 μ m | 0.5% | 5秒以内 | 10～50個以上の巨大なパールチェーンを形成 |
| 2 μ m | 0.2% | 20秒以内 | 10個程度のパールチェーンを形成 |
| 1 μ m | 0.1% | 1分 | 10個以下のパールチェーンを形成 |
| 0.45 μ m | 0.1% | 1分 | パールチェーンを形成せず |

【0044】実施例6 塩の濃度の影響（その1）

(1) 抗ミオグロビン抗体感作ラテックス試薬の調製
実施例1と同様にして調製した抗ミオグロビン抗体感作ラテックス試薬を遠心分離して上清を除去した後、沈殿を精製水に懸濁した。得られた懸濁液に対し、更に遠心分離、精製水に懸濁という上記の操作を5回繰り返して脱塩処理を行い、ラテックス濃度1%の懸濁液とした。

【0045】(2) 測定装置

図1の装置を使用しパールチェーンの形成、反応液の電気分解を観察した。

【0046】(3) 実験方法

塩化ナトリウム水溶液（600、300、150、75、50、25、12.5、6.25、3.2及び0m

M）と（1）で調製した脱塩抗ミオグロビン抗体感作ラテックス試薬をそれぞれ9：1で混合しラテックス濃度0.1%とした。交流電圧（周波数100KHz、方形波）を0～100V/mmの電界強度になるように印加し、パールチェーンの形成、反応液の電気分解を観察した。

【0047】(4) 結果

表5に示したように、反応系中の塩化ナトリウム濃度が0～600mMの間において約10V/mmの電界強度においてパールチェーンの形成が観察された。反応液の電気分解は、反応系中の塩化ナトリウム濃度が600mMの場合には13V/mmの電界強度で観察され、反応系中の塩化ナトリウム濃度が300mM以下の場合には

約20～30V/mmの電界強度で観察された。

【表5】

【0048】

| 塩化ナトリウム 濃度 (mM) | 電界強度 (V/mm) | |
|--------------------|-------------|---------|
| | パールチェーンの形成 | 電気分解の発生 |
| 600 | 8～13* | 13以上 |
| 300 | 16～18 | 18以上 |
| 150 | 15～23 | 23以上 |
| 50 | 5～23 | 23以上 |
| 25 | 8～24 | 24以上 |
| 3.2 | 8～29 | 29以上 |

* 5個以下のパールチェーン形成

その他は5個以上のパールチェーン形成

【0049】比較例1

直流パルス（周波数8KHz、パルス幅20μsec、20V/mm）を同様に印加したところ、反応系中の塩化ナトリウム濃度が6.25mM以上の場合には電気分解を起こし、パールチェーンの形成が観察されなかった。

【0050】実施例7 塩の濃度の影響（その2）

下記の表6に記載した濃度の塩化ナトリウムを反応系に含むようにGBSを用い抗ミオグロビン抗体感作ラテックス試薬を実施例1と同様にして調製した。交流電圧（周波数100KHz、電界強度20V/mm、方形波）を印加して、凝集度を実施例2と同様にして測定した。表6に示した結果から、塩化ナトリウムの濃度は10mM以上、好ましくは25～150mMであることが分かる。

【0051】

【表6】

| 反応系における 塩化ナトリウム濃度 (mM) | 凝集度 AR (%) | |
|------------------------------|------------|-------|
| | ミオグロビン濃度 | |
| | 0μg | 100μg |
| 5 | 15.3 | 30.2 |
| 10 | 16.4 | 30.5 |
| 25 | 18.9 | 72.0 |
| 50 | 20.8 | 80.6 |
| 150 | 28.2 | 86.9 |

【0052】実施例8

(1) 抗ミオグロビン感作ラテックス試薬の調製
実施例1と同様にして調製した。

【0053】(2) 測定装置

図1の装置を使用し生物学的特異的凝集反応を測定した。

【0054】(3) 測定方法

0.5%牛血清アルブミンのグリシン緩衝液溶液（0.5%BSA-GBS）を用いて、標準ミオグロビンを希釈し、濃度0、1.0、2.5、5.0、10、25、

50、100、及び250ng/mlの検体を調製した。これらの検体10μl、前述した抗ミオグロビン感作ラテックス試薬10μlをスライドガラス上で混合させ、前述した装置を用いて、周波数100KHzの交流電圧（方形波）を20V/mmの電界強度になるようにそれぞれ0.5、1.0及び1.5分間印加しパールチェーンを形成させた。この印加後、直ちに電源を切り1分間放置することにより免疫反応に関与していないラテックス粒子を再分散させた後、凝集度（AR）を測定した。

【0055】(4) 結果

図3に示した結果から、印加時間0.5分でほぼ十分な凝集度を示し、1.0～1.5分で凝集度はほぼ平衡になることが分かる。このことは、本発明により非常に短時間でしかも精度良く生物学的特異的反応性物質の存在を検出又は測定することが可能であることを示している。

【0056】実施例9

抗ミオグロビン抗体感作ラテックス試薬の調製、測定装置は実施例1と同様であった。0.5%牛血清アルブミンのグリシン緩衝液溶液（0.5%BSA-GBS）を用いて、標準ミオグロビンを希釈して、濃度0、0.1、1、2.5、5、10、25、50、100、及び250ng/mlの検体を調製した。これらの検体を実施例2と同様にして、ラテックス粒子の凝集度（AR）を測定した。

【0057】交流電圧の印加時間及び放置時間がそれぞれ1分の場合及びそれぞれ30秒の場合の結果を図4に示す。

【0058】比較例2

実施例9の各検体と抗ミオグロビン抗体感作ラテックス試薬を各50μlずつ反応チューブにとり、37℃で20分間インキュベーションした。この反応溶液20μlをスライドガラスにとり、実施例1と同様にして凝集度を測定した。結果を図4に示した。

【0059】図4から、本発明は従来（37℃

で、10～20分のインキュベーション時間が必要とされている)に比べ非常に短時間で、かつ高感度に測定することができることが分かる。

【0060】実施例10

(1) 抗ヒトAFP抗体感作ラテックス試薬の調製
抗ヒトAFP抗体(道東化学株式会社製)を用いて、実施例1と同様にして抗ヒトAFP抗体感作ラテックス試薬を調製した。

【0061】(2) 測定装置

図1の装置を使用し凝集反応を測定した。

【0062】(3) 測定方法

0.5%牛血清アルブミンのグリシン緩衝液溶液(0.5%BSA-GBS)を用いて、標準AFPを希釈し、濃度0.0、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10、50、100、500及び1000ng/mlの検体を調製した。これらの検体10 μ l、前述した抗ヒトAFP抗体感作ラテックス試薬10 μ lをスライドグラス上で混合させ、前述した装置を用いて、周波数100KHzの交流電圧(方形波)を16V/mmの電界強度で40秒間印加しパールチェーンを形成させた。反応系中のラテックス粒子の濃度は0.1重量%であった。40秒間の印加後、直ちに電源を切り40秒間放置することにより生物学的特異的凝集反応に関与していないラテックス粒子を再分散させた後、凝集度(A.R.)を測定した。

【0063】(4) 結果

結果を図5に示した。

【0064】比較例3

実施例10の各検体と抗ヒトAFP抗体感作ラテックス試薬を各50 μ lずつ反応チューブにとり、37℃で20分間インキュベーションした。この反応溶液20 μ lをスライドグラスにとり、比較例1と同様にして凝集度

を測定した。結果を図5に示した。

【0065】図5から、本発明は従来の方法(37℃で、10～20分のインキュベーション時間が必要とされている)に比べ非常に短時間で、かつ高感度に測定することができることが分かる。

【0066】

【発明の効果】本発明によれば、従来の測定方法よりも簡便且つ迅速に、しかも高感度で生物学的特異的反応性物質の存在を検出又は測定することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明で使用した生物学的特異的反応性物質の存在を検出又は測定するための装置の概略図を示す。

(A)は全体図、(B)はスライドグラスと電極の組合せ部の断面図である。

【図2】交流電圧の印加時の凝集度及び交流電圧の印加を停止し再分散させた時の凝集度の変化を表わすグラフである。

【図3】ミオグロビン濃度、交流電圧の印加時間と凝集度の関係を表わすグラフである。

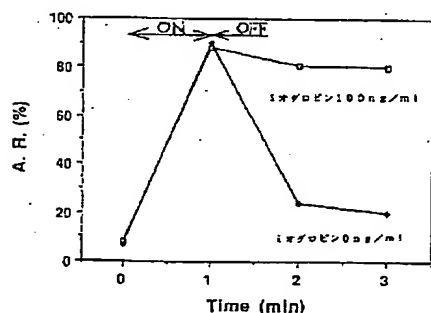
【図4】ミオグロビン濃度と凝集度の関係を表わすグラフである。

【図5】ヒトAFP濃度と凝集度の関係を表わすグラフである。

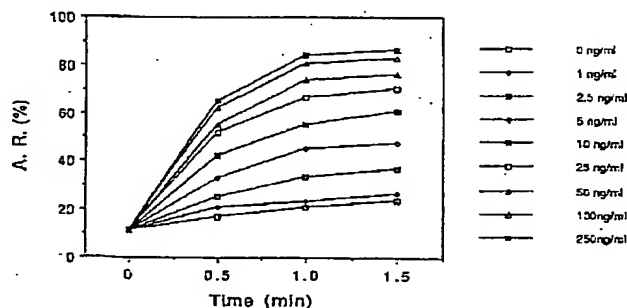
【符号の説明】

- 1、2：スライドグラス
- 3、4：電極
- 5：交流電源供給装置
- 6：オシロスコープ
- 7：蛍光顕微鏡
- 8：CCDカメラ
- 9：画像処理ボード
- 10：パーソナルコンピュータ

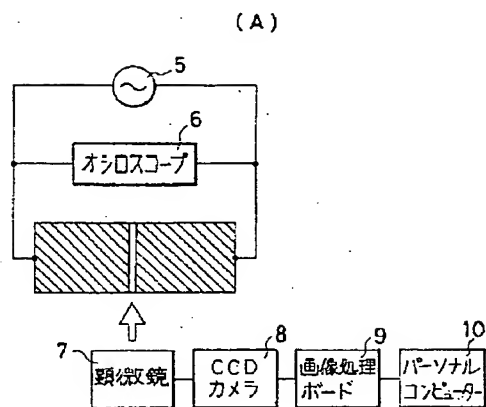
【図2】



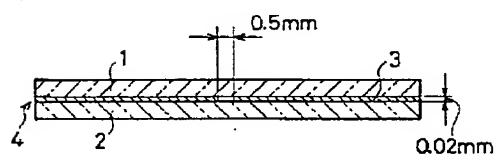
【図3】



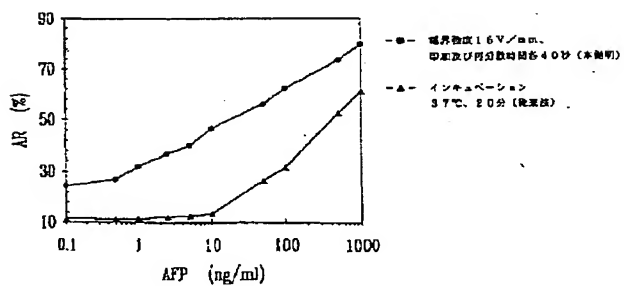
【図1】



(B)



【図5】



フロントページの続き

(56) 参考文献 特開 平5-66224 (JP, A)

(58) 調査した分野 (Int. Cl. 7, DB名)

G01N 33/543 581

BIOSIS (DIALOG)

JICSTファイル (JOIS)